In vitro Etablierung und partielle Charakterisierung von zwei spontanen Hirntumoren des Hundes

Brigitte Müller

1979

Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
(Prof. Dr. E. Dahme)
am Institut für Tierpathologie der Universität München
Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. D. Stavrou

IN VITRO ETABLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG VON ZWEI SPONTANEN HIRNTUMOREN DES HUNDES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Brigitte Müller
aus Büderich

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. D. Stavrou
Korreferent:	Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr

Tag der Promotion: 23.Februar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEM VATER

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0039

INHALTSÜBERSICHT

	SEITE
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Zell- und Gewebezüchtung	2
2. In vitro Züchtung neurogener Tumoren	3
3. Heterologe Transplantation von ZNS-Tumoren	5
4. S-100-Protein	6
5. Chromosomenanalyse	7
C. PROBLEMATIK	9
D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	11
I. Material und Methodik	11
1. Tumormaterial	11
2. Tumorzellkulturen	11
a) Primärkulturen	11
b) Subkulturen	12
c) Klonierung	13
3. Transplantation	14
4. Histologische Untersuchung	15
a) Tumorgewebe	15
b) Zellkulturen	15
5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	16
a) Tumorgewebe	16
b) Zellkulturen	16
6. "Scanning"-Elektronenmikroskopie	17
7. Nachweis des S-100-Proteins	17
8. Chromosomendarstellung	18
9. Zelldifferenzierung durch DB-cAMP-Behandlung	19

SEITE

II. Ergebnisse 20
1. Lichtmikroskopische Befunde 20
2. Elektronenmikroskopische Befunde 25
3. Zellkulturbefunde 30
4. "Scanning"-Elektronenmikroskopische Befunde 36
5. Immunofluoreszenz 37
6. Zelldifferenzierung durch Behandlung mit DB-cAMP 39
7. Chromosomenanalyse 41

E. DISKUSSION 44

F. ZUSAMMENFASSUNG 51

G. LITERATURVERZEICHNIS 53

A. EINLEITUNG

Die Gewebe- und Zellzüchtung hat in den letzten Jahren auf zahlreichen Gebieten der Medizin Bedeutung erlangt. Sie fand unter anderem eine breite Anwendungsbasis in der Beantwortung zellbiologischer, biochemischer und pharmakologischer Fragestellungen. Vor allem die Zellzüchtung ermöglicht es, unter weitestgehend standardisierbaren Bedingungen des extrazellulären Milieus, an Zellen gut kontrollierbare biochemische, pharmakologische und physiologische Untersuchungen durchzuführen. Mit Hilfe der in vitro Kultivation von Zellen lassen sich Untersuchungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene durchführen, ohne daß der Einfluß des gesamten Organismus berücksichtigt werden muß. Das Kulturgefäß erlaubt den direkten Einfluß von chemischen und physikalischen Reizen auf die Zelle zu studieren, und zwar unabhängig von einer Reihe schwer definierbarer Faktoren, wie sie im Organismus auf die Zelle einwirken. Über die Wirkung einer Substanz kann wesentlich schneller eine Aussage getroffen werden, erprobt man sie statt im Tierversuch an einzelnen Zellen in vitro. Darüber hinaus sind in vitro Versuche leichter manipulierbar, sowie reproduzierbar und meist mit geringerem Zeitaufwand verbunden als entsprechende in vivo Untersuchungen.

Die Verwendung von Zellkulturen als eine Methode zur Charakterisierung von Hirntumoren ist besonders im Hinblick auf die Heterogenität der Geschwülste des Nervensystems erfolgversprechender als rein histomorphologische Untersuchungen. Vorliegender Arbeit liegt als Fragestellung die Aufklärung der zytologischen Zusammensetzung, sowie die Untersuchung des in vitro Verhaltens spontaner Hirngliome des Hundes zugrunde.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Zell- und Gewebezüchtung

Rudolf VIRCHOW konnte in seiner berühmten "Cellularpathologie" (1858) begründen, daß "die Zelle als letztes eigentliches Formelement aller lebendigen Erscheinungen zu verstehen ist". Damit hatte er schon damals die Aufgabe der heutigen Zellbiologie vorgezeichnet, nämlich die Eigenschaften und Leistungen der aus dem Gewebeverband isolierten Zellen zu studieren.

Mit zu den ersten erfolgreichen in vitro Versuchen gehören die Untersuchungen von VIRCHOW (1858) an isolierten Flimmerzellen der menschlichen Trachea. Weitere Kurzzeitversuche, Zellen und Gewebe am Leben zu erhalten, unternahmen LOEB (1897) mit blutbildenden Zellen und LJUNGREEN (1897-1898), der menschliche Hautstückchen über mehrere Wochen lang in Aszitesflüßigkeit am "Leben" halten konnte.

Nach diesen ersten Experimenten konnte HARRISON (1907) mittels der Gewebezüchtung die Frage nach dem Ursprung der Nervenfasern klären. Seine "hanging-drop" Methode fand lange Zeit breite Anwendung im Versuch Warmblütergewebe zu kultivieren.

In den dann folgenden Jahren bis etwa 1931 waren es vor allem CARREL und BAKER (1926), die an der Entwicklung geeigneter Medien und wachstumsfördernder Zusätze arbeiteten.

Schon zwei Jahre später, 1933, berichteten VOGELAAR und EHRLICHMAN von der Anwendung des ersten synthetischen Mediums. Seither sind zahlreiche weitere synthetische

Medien entwickelt worden, und die modernisierte Technik der Kultivierung erlaubt heute die systematische Untersuchung an praktisch allen in vitro kultivierbaren Zellen.

Übersichtliche und detaillierte Angaben zu modernen Zellzüchtungsmethoden, sowie über die Zusammensetzung zahlreicher synthetischer Medien finden sich bei MAYR et al. (1974).

2. In vitro Züchtung neurogener Tumoren

Die ersten Anregungen zur Züchtung neurogener Tumoren in vitro kamen von FISCHER (1925) und von KIAER (1925). Sie konnten Gewebestückchen eines menschlichen Glioms zwei Monate am Leben erhalten.

Über erfolgreiche Kurzzeitkulturen von Astrozytomen und Meningomen berichten KREDEL (1928, 1929) und BUCKLEY (1929).

RUSSELL und BLAND (1933) nahmen 20 Tumoren des ZNS in Kultur. In 12 erfolgreichen Kultivationen gelang ihnen durch die Beobachtung der aus den Gewebestückchen auswandernden Zellen die Identifizierung des Tumorzelltyps.

Kenntnisse über das Wachstumsverhalten der einzelnen ZNS-Tumortypen in vitro beruhen im wesentlichen auf den Erfahrungen von KERSTING (1961, 1968). KERSTING erzielte mittels der Explantat-Technik eine hohe Ausbeute erfolgreicher Kultivationen menschlicher Hirngeschwülste über längere Zeit. Er konnte unter anderem feststellen, daß die Geschwindigkeit der Zellvermehrung in vitro ein

für jede Geschwulstart charakteristisches Merkmal darstellt. Von den Hirntumoren des Menschen ist weiter bekannt, daß sie je nach Tumortyp ein spezifisches Verhalten in der Zellkultur zeigen (KERSTING 1961).

In den folgenden Jahren wurde über zahlreiche Langzeitkulturen von ZNS-Tumoren berichtet. Zellinien menschlicher neuroektodermaler Geschwülste nahmen vorwiegend ihren Ausgang von Glioblastomen (MANUELIDIS 1965, PONTÉN und MACINTYRE 1968, LISS 1972). MANUELIDIS (1969) konnte zeigen, daß menschliche Glioblastome im Verlauf der Züchtung ein epitheliales Aussehen annehmen können. An einem über zehn Jahre kultivierten Glioblastomstamm konnte er das gliaspezifische S-100-Protein nicht nachweisen.

Diese Entdifferenzierung in vitro beobachteten auch PFEIFFER und WECHSLER (1972) an einer Neurinomkultur. Im Verlauf der Züchtung gingen die Linien zu einem m. o. w. undifferenziertem epitheloiden oder fibroblastoiden Wachstum über.

LUMSDEN (1955a) unterscheidet die Veränderungen, die in vitro proliferierendes Gewebe gegenüber der Struktur des Ausgangsgewebes erleidet, in eine "Disorganisation" des Zellverbandes und in eine eigentliche "Dedifferenzierung" auf zellulärem Niveau.

LISS (1972) berichtet dagegen von einem über fünf Jahre kultivierten Glioblastom mit konstanten Eigenschaften.

3. Heterologe Transplantation von ZNS-Tumoren

Die Annahme, daß sich Gliomzellen außerhalb des Zentralnervensystems nur schlecht entwickeln, konnte ZIMMERMANN (1961) widerlegen. Es gelang ihm in zahlreichen Tierversuchen primäre Hirngeschwülste subkutan, intramuskulär, intraperitoneal sowie intraocular im homologen System zum Anwachsen zu bringen. Über die erfolgreiche Transplantation von Geschwülsten des Zentralnervensystems im homologen System wurde noch mehrfach berichtet (WILKINS und KETCHAM 1963, 1964, SOLOWAY et al. 1964).

Von der Transplantation menschlicher Hirngeschwülste ins heterologe System berichten als erste GREENE und ARNOLD (1945). Sie verimpften drei Glioblastome und fünf Meningome auf Meerschweinchen und Mäuse. Dabei zeigte sich, daß die Transplantationstumoren der Meerschweinchen histologisch der ersten Generation wesentlich ähnlicher waren als die der Mäuse.

PERESE und MOORE (1960) berichten nach umfangreichen Untersuchungen über die Veränderungen der Transplantate im Muskel- oder Subkutangewebe. Von 27 Glioblastomen verwandelten sich im Subkutangewebe 80% in Sarkome.

Auch MANUELIDIS (1961) konnte durch heterologe Transplantation menschlicher Glioblastomzellen zeigen, daß es in vivo zu einer Veränderung der Glioblastomstruktur kommen kann. In späteren Versuchen (1969) fand derselbe Untersucher dann, daß besonders Langzeitkulturen menschlicher Gliome nach Transplantation zur Änderung der Histostruktur neigen, währenddessen niedrige Passagen die Morphe der Primärkulturen behielten.

Ziel der Transplantationsversuche ist in erster Linie, Histogenese, Wachstumsverhalten und Zellbiologie der in vitro kultivierten Tumoren nach in vitro/in vivo Wechselpassagen zu studieren.

4. S-100-Protein

Zur Aufklärung der Histogenese von ZNS-Tumoren und damit der Klassifikation dienen auch biochemische Untersuchungstechniken. In den letzten Jahren wurden viele spezifische Proteine des Nervensystems isoliert (HYDÉN 1959, MOORE 1965, BENNETT und EDELMAN 1968, HAGLID et al. 1975). Dabei wurde besonders eingehend das S-100-Protein untersucht. Das S-100-Protein ist ein stark saures - zu etwa 30% sind Glutamin- und Asparaginsäurereste beteiligt - Protein mit einem Molekulargewicht von 24.000 - 30.000. Es wurde von MOORE (1965) so genannt, weil es in 100%iger Ammoniumsulfatlösung bei neutralem pH-Wert löslich ist. Es gilt als gliaspezifisch, wurde aber auch in Neuronen (HYDÉN und McEWEN 1966, HAGLID et al. 1973b) und Achsenzylindern (PEREZ und MOORE 1968), nicht dagegen in mesenchymalen Zellen des Nervensystems gefunden.

Ergebnisse immunologischer Untersuchungen sprechen dafür, daß das S-100-Protein im ZNS vor allem in den Gliazellen synthetisiert wird (BENDA et al. 1968, LIGHTBODY et al. 1970, PFEIFFER et al. 1970, HERSCHMAN 1971). Einen Zusammenhang zwischen dem S-100-Gehalt und der Malignität der Gliome konnte bei menschlichen Glioblastomen (HAGLID und STAVROU 1973) und bei MNH-induzierten Gliomen der Ratte (STAVROU et al. 1973) beobach-

tet werden. In beiden Tumorgruppen nimmt bei zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren der S-100-Gehalt ab. Durch den intrazellulären Nachweis des S-100-Proteins mit der Immunofluoreszenztechnik ist es möglich, Gliazellen von mesenchymalen Zellen zu unterscheiden und auf diese Weise die Histogenese neurogener Tumoren zu klären.

5. Chromosomenanalyse

Untersuchungen über Zahl und Struktur der Chromosomen neoplastischer Zellen spielen in der Geschwulstforschung schon lange eine besondere Rolle, zumal eine der ältesten Theorien über die Tumorentstehung eine ursächliche Verknüpfung von Chromosomenaberrationen und neoplastischer Zelltransformation postulierte (BOVERI 1914).

Ebenso wie in anderen Geschwülsten treten auch in Tumoren des ZNS pathologische Teilungsvorgänge auf. SCHRÖDER und KAESS (1972) beschrieben in menschlichen Medulloblastomen und Glioblastomen abgesprengte Chromosomen, Granularmitosen und Chromosomenverklebungen und SWAEN et al. (1964) konnten zeigen, daß pathologische Mitosen vor allem in Gliomen, und zwar in der Nähe von Blutungen und Nekrosen auftreten.

Weitere Untersuchungen über die Chromosomenverhältnisse in neuroektodermalen Tumoren des Menschen liegen von HANSTEEN (1967) und WILSON et al. (1970) vor. Sie ergaben keinerlei Regelmäßigkeit bezüglich Abweichungen von Chromosomenzahl und Chromosomenmorphologie. Lediglich bezüglich des Vorkommens von Markerchromosomen berichten LUBS und SALMON (1965) über ein gehäuftes Auf-

treten kleiner telozentrischer Chromosomen, der sog. "double minutes", in Tumoren des ZNS.

Die Chromosomendarstellung in Langzeitkulturen dient in erster Linie zur Kontrolle der Homogenität von Zelllinien.

C. PROBLEMATIK

Das Schrifttum weist mittlerweile eine Fülle von Mitteilungen über Spontantumoren des ZNS beim Hund auf. Verschiedene Statistiken berichten von einer Häufigkeit neurogener Tumoren beim Hund von etwa 1% im Sektionsgut (McGRATH 1957, DAHME und SCHIEFER 1960, HOWARD und NIELSEN 1965). Dabei überwiegt der Anteil der neuroektodermalen Geschwülste mit 60% (McGRATH 1962). Rassenunterschiede bestehen insofern, als Gliome häufiger bei kurzschädeligen (brachycephalen) Rassen, wie Boxern, Bulldoggen (HENSCHEN 1955, McGRATH 1960, LUGINBÜHL 1962a), Meningome dagegen mehr bei langschädeligen (dolichocephalen) Rassen, z.B. Schäferhunden (FRANKHAUSER und LUGINBÜHL 1968) auftreten.

In der Gewebe- und Zellzüchtung experimenteller neurogener Tumoren konzentrierte sich das Interesse der verschiedenen Untersuchergruppen zumeist auf Nagetiere, wie Ratte, Goldhamster und Kaninchen, als Versuchsmodell. Nach Einführung der neurotropen Nitrosoharnstoffverbindungen durch DRUCKREY (1970), wurde in erster Linie bei oben genannten Tieren Tumoren erzeugt, jedoch wird auch über die erfolgreiche Anwendung chemischer Kanzerogene beim Hund berichtet (WARZOK et al. 1970, STAVROU und HAGLID 1972, STAVROU et al. 1975).

Kenntnisse über Biologie und Wachstumsverhalten neurogener Spontantumoren des Hundes in vitro liegen bislang keine vor. Sie zu erarbeiten erscheint aber vor allem deshalb notwendig, um zum einen die Voraussetzungen für die Beurteilung experimentell gewonnener Resultate zu schaffen und zum anderen um spontane Tumoren in ihrer zytologischen Zusammensetzung und in ihrem biologischen Verhalten charakterisieren zu können.

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, spontane Hirntumoren beim Hund in vitro zu züchten, ihre Struktur vor und nach Kultivation zu studieren, sowie Aussagen zu treffen über eventuelle Veränderungen nach in vivo Passagen durch subkutane Transplantation der Tumorzellen bei Balb c/nu nu Mäusen. Ferner sollten an etablierten Kulturen Fragen spezifischer Syntheseleistungen (S-100-Protein) und genetischer Stabilität (Chromosomenanalyse) untersucht werden.

D. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Material und Methodik

1. Tumormaterial

Die vorliegende Darstellung des Verhaltens von spontanen Tumoren des ZNS beim Hund in vitro und in vivo stützt sich auf die Auswertung von Befunden, die bei der Explantation und der Transplantation folgender spontaner Hirntumoren erhoben werden konnten:

1. Gliös-mesenchymale Mischgeschwulst (Protokollnummer 357/76) bei einem Boxerhund, weiblich, 1 1/2 Jahre alt. Lage des Tumors: rechts im Stammhirn, nach kranial ins Diencephalon, nach kaudal ins Mesencephalon reichend. Makroskopisch handelt es sich um einen ca. haselnußgroßen unscharf begrenzten Tumor von grauweißer Farbe.

2. Astrozytom (Protokollnummer 166/77) bei einem Boxerhund, weiblich, 7 1/2 Jahre alt. Der Tumor hat seinen Sitz im rechten Lobus piriformis, ist von grauweißer Farbe, unscharf begrenzt, etwa daumengliedgroß und von einzelnen punktförmigen Blutungen durchsetzt.

2. Tumorzellkulturen

a) Primärkulturen

Zur Züchtung des Tumormaterials dienten als Kulturgefäße Falcon-Plastikflaschen (Seromed München), die Bodenfläche von Vierkantglasflaschen, sowie Deckgläschen, sog. "cover slips" in Leighton tubes.

Die für die in vitro Züchtung entnommenen Tumorstückchen wurden in sterile Petrischalen überführt und in steriler PBS-A-Lösung (Ca^{++} und Mg^{++} - freie Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebestückchen mit einer Schere bis auf eine Kantenlänge von 0,5 - 1 mm zerkleinert und in Falcon-Plastikflaschen explantiert. Nach dem Antrocknen der Gewebestückchen wurden sie mit Medium (M 199, Seromed München), das 20% fetales Kälberserum (FKS, Seromed München) sowie Antibiotika (100 I.E. Penicillin/ml, 100 µg Dihydrostreptomycin/ml) enthielt, vorsichtig überschichtet. Die pH-Einstellung des Nährmediums erfolgte durch Zugabe von 8,8% $NaHCO_3$. Die Kulturen wurden in geschlossenem System bei 37°C bebrütet.

b) Subkulturen

Zur Herstellung von Subkulturen wurde das Medium der Einschichtzellkulturen abgegossen, der Zellrasen mit STV-Lösung (Saline-Trypsin-Versen, MARCUS et al. 1956) vorgewaschen und erneut mit 1-2 ml STV überschichtet. Die Kulturen blieben 5-10 Minuten im Brutschrank bei 37°C, bis sich der Zellrasen durch die STV-Wirkung von der Unterlage gelöst hatte. Vorsichtiges Schütteln des Kulturgefäßes unterstützte die Ablösung. Der abgelöste Zellrasen wurde in etwas Medium mit 10% FKS-Zusatz resuspendiert und dann im Verhältnis 1:2 bzw. hohe Passageraten im Verhältnis 1:4 bis 1:6 geteilt und auf neue Kulturgefäße übertragen.

c) Klonierung

Die Klonierung der Kultur 357/76 wurde vier Monate nach Kultivationsbeginn in der 31. Passage, bei Kultur 166/77 4 1/2 Monate nach Kultivationsbeginn in der 35. Passage durchgeführt. An Kultur 357/76 erfolgten nach jeweils zehn weiteren Passagen erneut zwei Klonierungen.

Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert und fünf Minuten bei 800 U/min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Medium aufgenommen und resuspendiert. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Zellzahl pro Kulturgefäß auf ca. 20 Zellen pro ml eingestellt. Nach dem Auswachsen von sichtbaren Zellkolonien (nach durchschnittlich zehn Tagen) wurden die einzelnen Klone abtrypsiniert. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen auf jede abzutrypsinierende Kolonie ein etwa 5 mm hoher Metallzylinder aufgesetzt. In diesen wurde mit einer Pasteurpipette drei Tropfen STV-Lösung gegeben. Nach einer Einwirkungszeit von etwa 5 Minuten wurden die Zellen mit Pasteurpipetten aufgezogen und in neue Kulturgefäße mit 5 ml Medium (20% FKS-Zusatz) gebracht.

Nach dreimaliger Subklonierung wurden die Subklone wieder als Kultur weitergezüchtet.

3. Transplantation

Für die in vivo Züchtung der in vitro etablierten Tumoren wurden Balb c/nu nu Mäuse verwendet.

Die Kultur 357/76 wurde in der 17. und 50. Passage, sowie ein Klon dieser Kultur (357/76 C) in der 6. Passage, die Kultur 166/77 in der 15. und 30. Passage transplantiert. Zur Erzeugung von Transplantationstumoren wurden den Mäusen 1 x 10^6 Zellen, in 0,5 ml Medium suspendiert, im Inguinal- bzw. Rückenbereich s.c. injiziert.
Nach durchschnittlich 2-3 Wochen erreichten die Tumoren Erbsengröße (Abb. 1).

Die Tiere wurden mit Äther euthanasiert, die Tumoren steril entnommen und aus einem geeigneten Teil Explantatkulturen, wie oben beschrieben, angelegt. Nach ca. zwei Tagen konnte die Emigration der Zellen aus dem Geschwulstzellverband beobachtet werden.

Abb. 1: Tumor bei Balb c/nu nu Maus; 6 Wochen nach subcutaner Inoculation von ca. 1 x 10^6 Zellen aus der Tumorkultur der Mischgeschwulst (Tumor A).

4. Histologische Untersuchung

a) Tumorgewebe

Ein Teil der Ursprungstumoren sowie ihrer Transplantationstumoren wurde für lichtmikroskopische Untersuchungen in 6%igem neutralem Formol fixiert und in Paraplast eingebettet. Die anschließende Färbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxilin-Eosin sowie nach NISSL.

b) Zellkulturen

Für die lichtoptische Untersuchung der Zellkulturen wurden die Zellen auf Deckgläschen in "Leighton-tubes" ausgesät. Die dicht bewachsenen Lamellen wurden aus den Röhrchen genommen und mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Dazu wurden die Lamellen zuerst 2-3 mal in PBS-A (Ca^{++} und Mg^{++} - freie Phosphate-Buffered-Saline, pH 7,2) gewaschen und anschließend in Bouin-Lösung fixiert. Nach einer absteigenden Alkoholreihe (95%, 95%, 70%) und nach dem Spülen in aqua bidest., wurden die Lamellen 10 min mit Hämatoxilin gefärbt, anschließend gewässert und dann 2 min in Eosin kontrastiert. Vor der Einbettung in Eukitt wurden die Lamellen in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert.

5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

a) Tumorgewebe

Hierzu wurden Tumorstückchen in dünne Scheiben geschnitten und zur Fixation 2 Stunden in 6,25%igem Glutaraldehyd aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Waschung der Proben in Sörensen-Phosphat-Puffer und danach eine zweite Fixation in 1%igem Osmiumtetroxid. Zum Schneiden wurden die Proben, nach Dehydrierung in Azeton, in Epon eingebettet.

b) Zellkulturen

Dicht bewachsene Zellkulturflaschen wurden nach Heraustrennen des oberen Teils der Flasche mit einem erhitztem Skalpell in situ dreimal mit PBS-A gewaschen und daran anschließend zur Fixation mit 2,5%igem Glutaraldehyd übergossen. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde das Fixationsmittel abgegossen und die Kulturen erneut 5 mal in PBS-A gewaschen und danach 1 Stunde mit Osmiumtetroxid nachfixiert. Nachdem die Kulturen in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert waren, wurden die Flaschen in reinem Epon eingebettet und im Brutschrank bei 37°C ca. 6 Tage gehärtet.

6. Scanning Elektronenmikroskopie *

Dicht bewachsene "cover slips" wurden nach dem Waschen mit PBS-A in 1%igem Glutaraldehyd fixiert und mittels einer aufsteigenden Alkohol- bzw. Isoamylacetatreihe entwässert. Danach wurden die Präparate in der critical-point-Anlage (Bomar SPC-900/Ex^2) getrocknet, mit Gold (3,5 min 5-6 Ampère) bedampft und im Rasterelektronenmikroskop (Cambridge S 4-10) bei 20 kV, einer Scanning Periode von 100 sec und einem mittleren Arbeitsabstand von 12 mm untersucht.

7. Nachweis des S-100-Proteins

Der Nachweis des gliaspezifischen S-100-Proteins erfolgte bei der Kultur 357/76 in der 2., 15. und 50. Passage, sowie bei der Kultur 166/77 in der 10., 15. und 53. Subkultur, an jeweils subkonfluenten Deckglaskulturen. Als Nachweismethode kam die Immunofluoreszenz (Sandwich-Technik nach COONS et al. 1957) zur Anwendung.

Die Lamellen wurden nach dreimaligem Waschen in PBS-A 30 sec mit kaltem Azeton fixiert bzw. unfixiert belassen. Auf die Lamellen wurde vorsichtig mit einer gebogenen Pasteurpipette Anti-S-100-Serum in verschiedenen Verdünnungen (1:2 - 1:32) vom Kaninchen verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten im Brutschrank bei

---

* Die Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kurt Zänker, Institut für Experimentelle Chirurgie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, hergestellt.

37°C, wurden die Lamellen erneut in PBS-A gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit Fluoresceinisothiocyanat-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Globulin von der Ziege (1:32) über 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurden die Lamellen abermals in PBS-A gewaschen und danach mit gepuffertem Glycerol eingeschlossen. Als Kontrollen dienten Lamellen, die mit absorbiertem Anti-S-100 bzw. ohne Anti-S-100-Serum mit normalem Kaninchenserum inkubiert wurden.

8. Chromosomendarstellung **

Bei ein bis zwei Tage alten Subkulturen wurde dem Medium 0,5 ml einer 0,4%igen Colcemidlösung zugegeben, wodurch es zu einer Metaphasenanreicherung kommt. Die optimale Dauer der Colcemideinwirkung ist je nach Zellart verschieden, bewegt sich aber etwa im Bereich von 1-6 Stunden. Wir ließen das Colcemid 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank einwirken. Dann wurde das Medium abgegossen. Die Zellen wurden abtrypsiniert und 5 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Für die hypotonische Behandlung wurden die Zellen in 5-10 ml einer 1%igen Na-citratlösung resuspendiert. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde erneut zentrifugiert, bei 1200 U/min fünf Minuten lang. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Fixierung der Zellen mit frisch angesetztem Methanol-Eisessig (3:1) vorgenommen. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 1200 U/min) wurde die Fixation w.o. be-

---

** Die Darstellung sowie Auswertung der Chromosomen wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. I.-D. Adler, Institut für Biologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, München, durchgeführt.

schrieben wiederholt. Danach wurde 1 ml des Fixationsmittels auf die Zellen gegeben, so daß eine milchig-trübe Flüssigkeit entstand, und die Zellen darin suspendiert. Von dieser Suspension wurden mit einer Pasteurpipette etwa drei Tropfen auf einen fettfreien Objektträger gegeben und in der Flamme getrocknet. Anschließend erfolgten Färbung in 5%iger Giemsa-Lösung und Einschluß in Eukitt.

9. Zelldifferenzierung durch DB-cAMP-Behandlung

MADERSPACH und PARKAS (1973) fanden, daß das cyklische Adenosin-3'5'-Monophosphat (cAMP) in der Kultur die Zellmorphe, Zelladhäsion und Zytodynamik reguliert. Für Versuche an Zellkulturen wurde das lipophile, azylierte Nukleotid-Derivat, das N^6-2'-O-Dibutyryl-Adenosin-3'5'-Monophosphat (DB-cAMP) verwendet, welches die Zellen leichter permeiert. Den Einfluß dieses Derivates auf die Zellstruktur und Zellfunktion beschreiben MACINTYRE et al. (1972). Für unsere Versuche wurden Zellkulturen beider Tumoren dünn in Leighton tubes ausgesät und mit 2,5 ml Nährmedium überschichtet. Das DB-cAMP wurde in aqua bidest. gelöst und steril filtriert. Dem Medium der Kulturen wurde nach 48 Stunden 0,1 ml der 25 mM Lösung zugegeben. Nach 12 Stunden wurde die Behandlung der ersten Kulturen von 357/76 und 166/77 beendet, die Kulturen gefärbt und untersucht. Die Behandlung weiterer Kulturen wurde nach 24 bzw. 36 Stunden beendet.

II. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopische Befunde

Primärtumor A (gliös-mesenchymaler Mischtumor) Nr. 357/76

Histologisch lassen sich innerhalb der Geschwulst zwei sowohl in den Zellformen als auch in der Architektur voneinander abweichende Gewebsbilder unterscheiden. Den größeren Teil der Geschwulst nimmt ein zellreiches, mittelgradig vaskularisiertes Tumorgewebe ein. Das Zellbild macht in der Übersichtsdarstellung einen recht unruhigen Eindruck. Die Zellen liegen ungeordnet in einem lockeren, netzigen Verband. Sie sind in der Regel plasmareich und besitzen mittelgroße bis große Kerne von rundlicher und bohnenförmiger Gestalt (Abb. 2a). Sie weisen nur selten mehr als ein bis zwei Nukleolen auf. Dazwischen finden sich in recht geringer Anzahl mitotische Figuren und Riesenzellen. Die Kerne liegen meist exzentrisch und weisen einen mittleren Chromatingehalt auf. Die mittel- bis großleibigen Zellen bilden keine Fortsätze aus. Die Blutgefäße verhalten sich unterschiedlich: Neben dünnwandigen, kapillarähnlichen Gefäßen kommen solche mit geschwollenen Endothelzellen vor.

Aufgrund der beschriebenen Gestaltsmerkmale ist diese Tumorkomponente als ein malignes Astrozytom vom protoplasmatischem Typ zu bezeichnen.

Bei der zweiten Tumorkomponente handelt es sich um ein ebenfalls zellreiches Geschwulstbild mit starkem Faseranteil. Die Zellen sind teils großleibig, teils schmal und länglich und in einigen Abschnitten in parallelen Zügen angeordnet (Abb. 2c). Die Kerne sind teils ge-

schwollen, teils stäbchenförmig und chromatinarm bzw. deutlich euchromatisch. Daneben herrschen Areale mit angedeuteter Wirbelbildung vor (Abb. 2b). Teilweise sind die Kerne so zusammengerückt, daß man von Verklumpung sprechen kann. Die Zellgrenzen sind häufig unscharf, so daß die Zellgruppen an Synzytien erinnern.

Unter Berücksichtigung des beschriebenen Gewebsbildes ist für den zweiten Tumortyp ein endotheliomatös-fibromatöses Meningom anzunehmen.

Primärtumor B (Astrozytom) Nr. 166/77

Dieser Tumor besteht in erster Linie aus kleinen bis mittelgroßen fortsatzreichen Zellen, die kaum zu Pleomorphie neigen. Fasern treten innerhalb der Geschwulst in unterschiedlicher Dichte auf (Abb. 3a). Die mittelgroßen Zellen besitzen runde bis bohnenförmige Kerne von mittlerem Chromatingehalt. Das Heterochromatin ist unregelmäßig verteilt, z.T. deutlich verklumpt. Es finden sich keine Nekrosen und nur sehr vereinzelt Mitosefiguren. Bisweilen treten plasmareiche Tumorzellen auf. An der Vascularisation sind hauptsächlich Kapillaren beteiligt. An regressiven Veränderungen sind vereinzelte, durch Verschleimung entstandene, solitäre Zysten zu nennen. Auffallend sind die immer wieder auftretenden Kugelblutungen (Abb. 3b).

Zytomorphologie und Tumorarchitektonik sprechen für das Vorliegen eines weitestgehend differenzierten kleinzelligen Astrozytoms.

Transplantationstumoren

Histologisch zeigen die vom Primärtumor A (357/76) abgeleiteten Transplantationsgeschwülste ein recht unterschiedliches Zellbild. Teils findet sich eine Anordnung der Zellen in Zügen teils in deutlichen Wirbeln. Längliche schmale Zellen wechseln mit großleibigen z.T. polymorph gestalteten ab. Die Kerne haben längliche z.T. bohnenförmige Gestalt, oder sie sind mehr rundlich mit deutlicher Kernmembran und liegen überwiegend exzentrisch. Sie erscheinen teils hell mit zartem Chromatingerüst, dann wieder dunkel mit stark verklumptem Chromatin. Besonders bei den länglichen Zellformen sind deutliche Zellfortsätze ausgebildet. Auffallend ist das zahlenmäßig hohe Vorkommen von abnormen Mitosefiguren sowie das gehäufte Auftreten von riesenzellartigen Bildungen.

Wuchsform und Gesamtorganisation der Transplantationstumoren von Primärtumor B (166/77) erfahren keine Veränderung in dem Maße wie jene von Tumor A. Die überwiegend fortsatzreichen Zellen besitzen kleine teils bizarr gestaltete Kerne, die in bestimmten Arealen des Tumors in Gruppen zusammenliegend auftreten (Abb. 3c). Eine bestimmte Zellanordnung läßt sich nicht erkennen. Auch hier treten im Gegensatz zum Originaltumor riesenzellartige Bildungen und pathische Mitosefiguren auf.

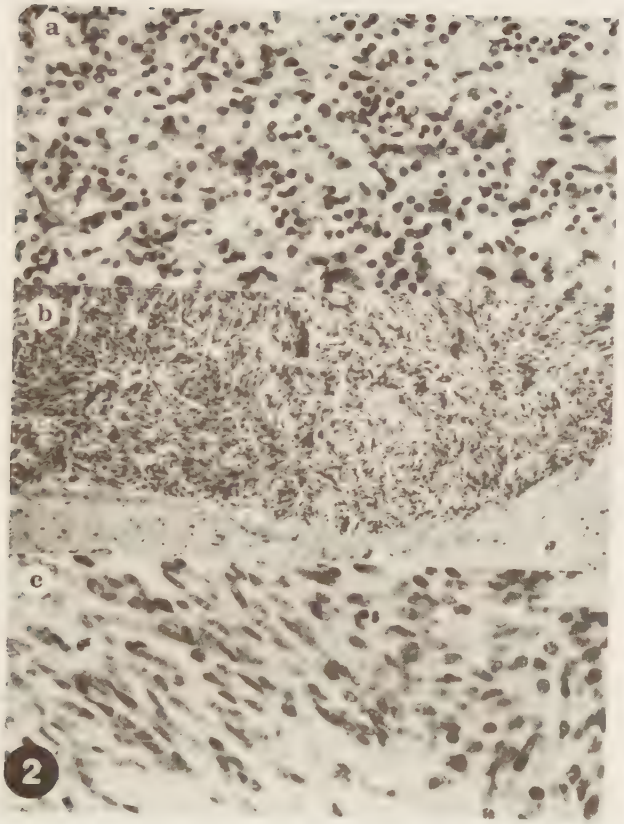

Abb. 2: Primärtumor A

a. astrozytäre Komponente;HE 300x

b. sarkomatöser Anteil mit angedeuteter Wirbelbildung der Zellen; HE 200x

c. sarkomatöser Anteil mit teilweise in parallelen Zügen angeordneten Zellen; HE 300x

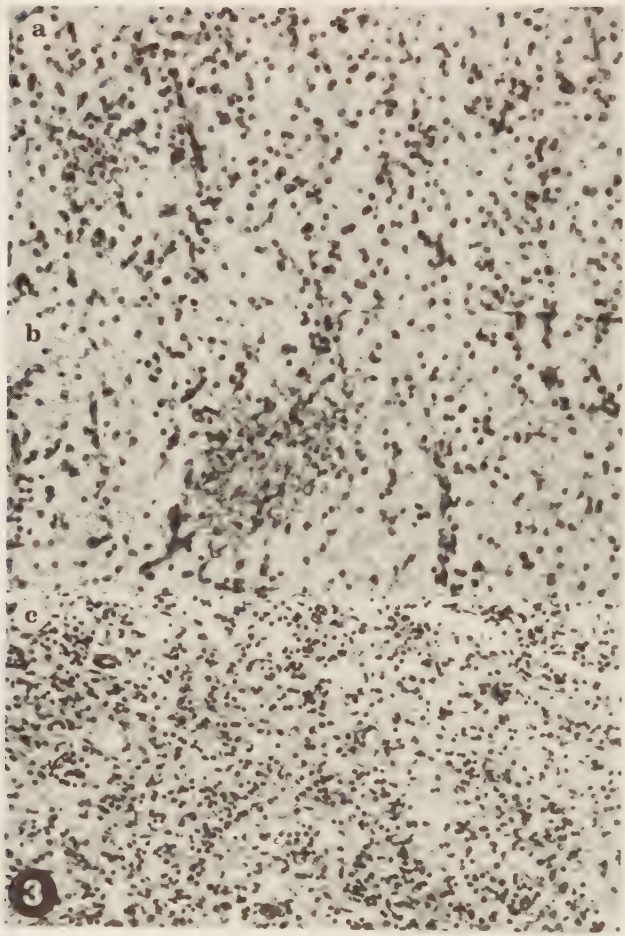

Abb. 3a, b: Primärtumor B = Astrozytom mit unterschiedlichem Faseranteil und deutlicher Kugelblutung; HE 200x

Abb. 3c: Transplantationstumor vom Primärtumor B abgeleitet, mit teils verklumpten Kernen und einigen riesenzellähnlichen Bildungen; HE 200x

2. Elektronenmikroskopische Befunde

Primärtumor A (gliös-mesenchymaler Mischtumor) Nr. 357/76

Elektronenmikroskopisch stellt sich der als Mischtumor diagnostizierte Tumor als sehr gestaltenreich dar. Bei den sehr dicht nebeneinanderliegenden Zellen fehlt jegliche fibrilläre oder amorphe Zwischensubstanz. Die unterschiedlich großen Kerne sind von z.T. rundlicher von z.T. länglicher, vereinzelt auch von gelappter Form. Das Heterochromatin ist vorwiegend marginal angeordnet, wobei das Zellkerninnere hell erscheint. Der relativ schmale Zytoplasmasaum ist reich an subzellulären Strukturen, wie z.B. großen, rundlichen Mitochondrien vom Crista-Typ, rauhem endoplasmatischem Retikulum oder freien Ribosomen. Zwischen einzelnen Zellen scheinen haftstellenartige dunkle Verdichtungszonen zu bestehen (Abb. 4).

Primärtumor B (Astrozytom) Nr. 166/77

Die fortsatzreichen Zellen besitzen in Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopischen Befund runde bis längliche Kerne, deren Heterochromatin klumpenförmig entlang der Kernmembran angeordnet ist. Bei den zwischen den benachbarten Zellen auftretenden Haftstellen handelt es sich wohl um sog. "gap junctions".

Das Zytoplasma ist reich an rundlichen Mitochondrien vom Crista-Typ. Daneben enthält es Polysomen und ein gut entwickeltes z.T. erweitertes rauhes Endoplasmatisches Retikulum (EPR). Die teilweise gebündelten, teilweise ungeordnet im Plasma liegenden Gliafilamente finden sich sowohl im Perikaryon als auch in den Zellfortsätzen und weisen eine Länge von ca. 60-70 nm auf (Abb. 5).

Transplantationstumoren

Im elektronenmikroskopischen Bild der Transplantate von Tumor A zeigt sich ein sehr dicht gewachsener Zellrasen. Die Einzelzellen sind teilweise untereinander durch ihre Fortsätze verzahnt und besitzen spezielle Haftstellen. Die Kerne sind von länglicher oder rundlicher Gestalt mit einer undulierten Kernmembran. Das Heterochromatin liegt z.T. marginal z.T. verklumpt im Kerninnern. Manche Zellen besitzen nur ein schmales Perikaryon, andere dagegen einen breiten Zytoplasmasaum.

Im Zellplasma liegen reichlich Organellen, wie Mitochondrien, rauhes EPR und Golgizonen. In allen Transplantatzellen werden sowohl perinukleär als auch in den Fortsätzen feinste Filamente gefunden, die ungeordnet oder auch in parallelen Zügen liegen (Abb. 6).

In den Transplantaten von Tumor B liegen die Zellen dicht nebeneinander, ohne erkennbare Interzellularsubstanz. Die Einzelzelle ist länglich oder dreieckig und besitzt einen länglich-ovalen bis rundlichen Kern. Es können zahlreiche Mitosen beobachtet werden. Die an den Kontaktflächen der Zellen auftretenden verdichteten Zonen sind als spezielle Haftorganellen, sog. "gap junctions", aufzufassen. Das Heterochromatin ist auffallend unregelmäßig verteilt. Das Zytoplasma ist sehr reich an Organellen, wobei besonders der gut ausgebildete Golgiapparat und das ausgeprägt entwickelte rauhe EPR auffallen. Feine Filamente und rundliche Mitochondrien sind gleichmäßig im Plasma verteilt.

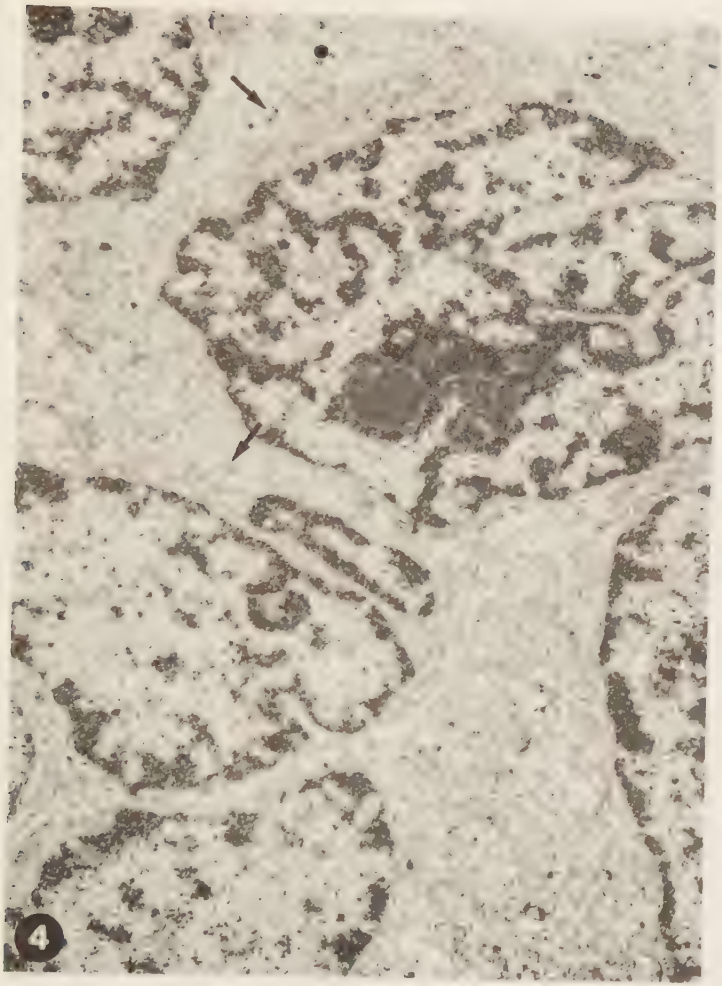

Abb. 4: Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild des Mischtumors (Tumor A): gliöse Komponente mit "gap junctions" (⟷) und wenigen Gliafilamenten.
11.250x

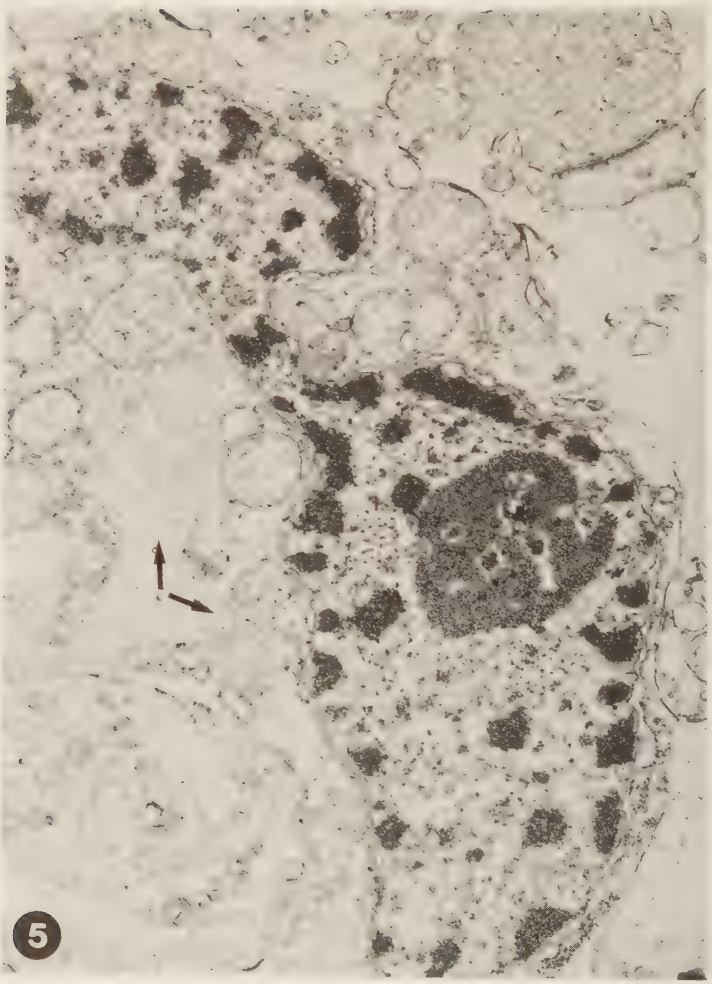

Abb. 5: Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme des Astrozytoms (Primärtumor B) mit ausgeprägten Gliafilamenten (➡).
20.300x

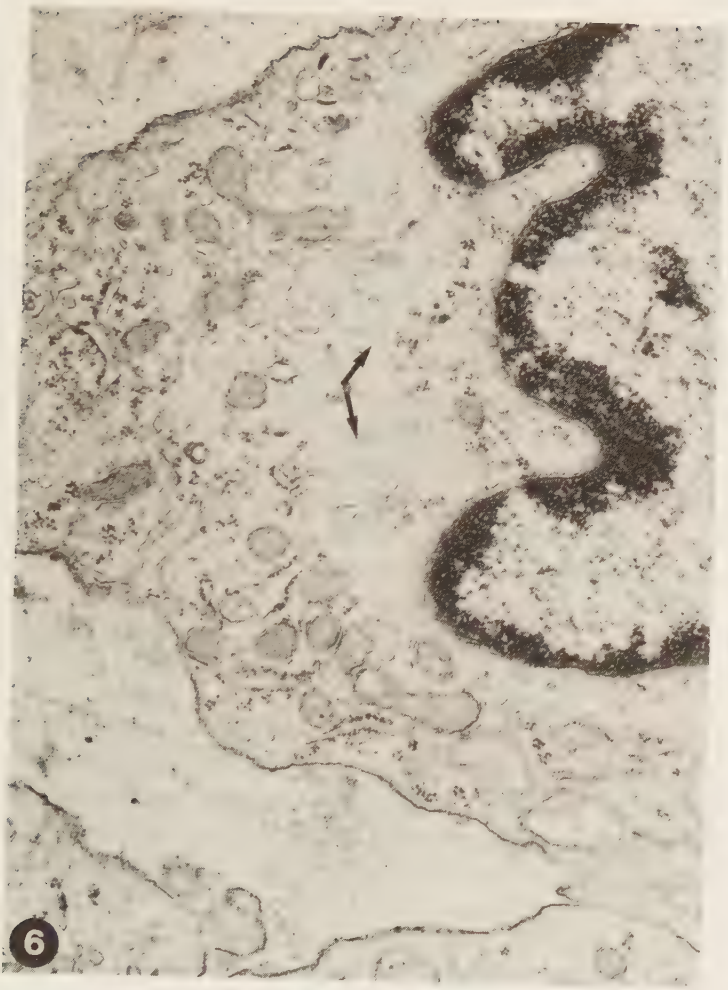

Abb. 6: Ultrastrukturelles Bild des vom Mischtumor (Tumor A) abgeleiteten Transplantationstumors mit typischen astrozytären Filamenten (➞). 28.000x

3. Zellkulturbefunde

Tumor A (Gliös-mesenchymale Mischgeschwulst) Nr. 357/76

Das Bild der Primärkultur wird zunächst von den aus den Explantaten auswandernden Zellen geprägt. Der Tumor zeichnet sich in vitro durch eine sehr hohe Proliferationsgeschwindigkeit aus. Der erste Nährmediumwechsel erfolgte bereits nach 24 Stunden. In den ersten Subkulturen wachsen, neben Fibroblasten und Fibrozyten, Gliazellen mit langen Zellfortsätzen (Abb. 7a). Die besondere Länge ihrer Fortsätze und das geringe Zytoplasma unterscheiden sich deutlich von den mehr breitspindeligen Zellen mesenchymalen Charakters. Letztere sind nach etwa 5-6 Passagen ganz verschwunden. Der Zellrasen besteht nun ausschließlich aus sehr grazilen, vorwiegend bipolaren Zellen. Die spindelförmigen Zellen sind langgestreckt, besitzen zwei lange Fortsätze und einen meist zentral gelegenen ovalen Kern. Sie proliferieren vorwiegend parallel zueinander, jedoch mit Zwischenräumen, so daß kein geschlossener Zellrasen entsteht.

Mit zunehmender Kultivationsdauer ist der Verlust der für Gliazellen typischen Ausbildung langer Zellfortsätze zu beobachten: Nach etwa 2-3-monatiger Kultivation haben die Kulturen ein völlig anderes Aussehen. Das Perikaryon der meisten Zellen haftet nun breitflächig auf der Unterlage und bildet in der Regel nur mehr ein bis zwei stummelige Fortsätze (Abb. 7b). Nur noch wenige Zellen der ursprünglich länglichen Gestalt mit länglichem Kern und langen Fortsätzen finden sich dazwischen. Diese epitheloide Morphe wird auch nach Transplantation der Zellen in verschiedenen Passageraten beibehalten. Auch durch Klonierung der Zellen läßt sich die ursprüngliche Zellform

nicht wieder herauskristallisieren.

Die Kulturen der Transplantationsgeschwülste zeichnen sich durch eine Zunahme von mehrkernigen Riesenzellen, Nekrosen sowie mehrkerniger astrozytenähnlicher Zellen mit plumpen Fortsätzen aus.

Elektronenmikroskopisch wird das Bild in den frühen Subkulturen von zahlreichen Fibrozyten geprägt, die in späteren Subkulturen nicht mehr nachweisbar sind. Vielmehr sind die Tumorzellen in diesen späteren Subkulturen fortsatzreich und untereinander durch sog. Verdichtungszonen in Kontakt. Die großen teils eingekerbten Kerne besitzen ein überwiegend verklumptes Heterochromatin, welches teils in der Mitte der Kerne, teils auch als schmaler Saum entlang der Kernmembran angeordnet ist. Durch die zahlreich vorhandenen Mikrovilli kommt es zu einer Oberflächenvergrößerung der Zellen. Im Zytoplasma liegen zahlreiche Mitochondrien, ein stark ausgeprägtes EPR, multiple Polysomen und ein gut markierter Golgiapparat.

Tumor B (Astrozytom) Nr. 166/77

Dieser Tumortyp zeichnet sich in vitro durch eine anfangs geringere Proliferationsgeschwindigkeit als der oben beschriebene Typ aus. Mit Zunahme der Kultivationsdauer kommt es jedoch auch bei diesem Tumor zu einer Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit.

Von Anfang an beherrschen zytoplasmareiche, bizarr geformte, teils großleibige Zellen mit kolbigen oder sternförmigen Fortsätzen und großen, überwiegend runden, teils exzentrisch liegenden Kernen das Bild (Abb. 8). Dazwischen liegen vereinzelt langgestreckte, piloide astrozytäre Zellen. Wuchsform und Aufbau der kultivierten Zellen ändern sich auch nach ihrer Transplantation und Rekultivation nicht. Die Zellen behalten die für sie typische Struktur sowohl in Transplantatkulturen als auch in den Langzeitkulturen bei. Es kommt wie bei den Tumortransplantatkulturen von Tumor A zur Zunahme von riesenzellähnlichen Bildungen.

Elektronenmikroskopisch haben die länglich geformten Zellen ein schmales Perikaryon und weitausladende Fortsätze. Die länglich-ellipsoiden Kerne erscheinen hell, da das Heterochromatin vorwiegend als schmaler Saum entlang der Kernmembran angeordnet ist. Wie bei Tumor A hat auch hier die Zelloberfläche durch zahlreiche Mikrovilli eine Oberflächenvergrößerung erfahren. Zwischen den Zellen bestehen wiederum Verbindungen in Form der "gap junctions". Im Zytoplasma fallen zahlreiche Polysomen auf, während das rauhe EPR nur schwach ausgebildet ist. Die zahlreichen Mitochondrien sind von lang ausgezogener, zigarrenförmiger Gestalt. Im gesamten Zytoplasma, sowohl im Perikaryon als

auch in den Fortsätzen liegen Fibrillen verstreut, ohne daß eine Bündelung erkennbar wäre. Ihre Länge beträgt ca. 60-70 nm. Die gesamte Zellmembran ist von Pinozytosevesikeln besetzt (Abb. 9). Vereinzelt können auch lamellär geschichtete Einschlüsse beobachtet werden.

Abb. 7: Subkonfluente Kultur von Tumor A: Großmaschiges Gitternetz zarter plasmatischer Zellfortsätze in der 10. Passage (a), bzw. plump wirkende Zellen mit breiterem Zytoplasmasaum in der 30. Passage (b); HE 200x

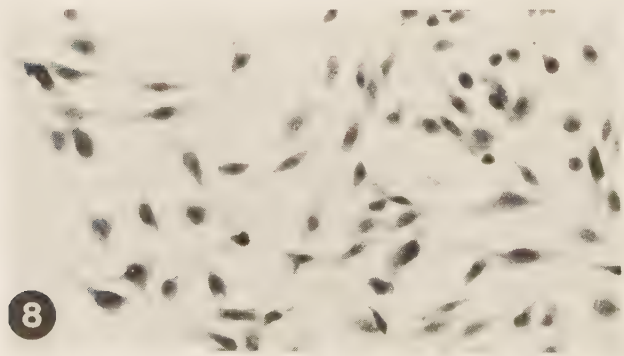

Abb. 8: Subkonfluente Kultur von Tumor B: Protoplasmareiche Zellen mit weniger ausladenden Zellfortsätzen in der 10. Passage; HE 200x

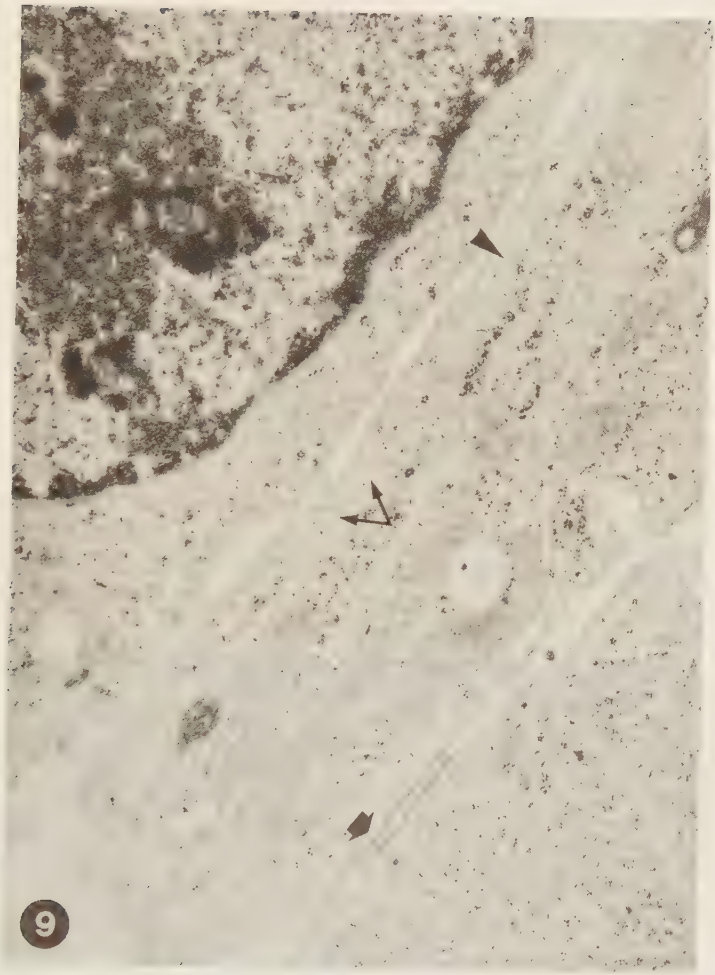

Abb. 9: Zellkulturaufnahme vom Astrozytom (Tumor B) in der 10. Passage mit typischen Zellorganellen: Gliafilamente (▶), Pinozytosevesikel (→) und "gap junctions" (⬟). 18.000x

4. Scanning Elektronenmikroskopische Befunde

In den Tumorkulturen lassen sich verschiedene Zellformen erkennen: In Tumorkultur A dominieren ovale Zellformen mit lang ausgezogenen Fortsätzen. In den Kulturen von Tumor B finden sich Zellen von kugeliger Gestalt ohne Fortsätze (Abb. 10a) und daneben solche mit flach ausgebreitetem Zelleib und angedeuteten Fortsätzen (Abb. 10b).

Eine Gemeinsamkeit der Kulturen beider Tumoren besteht in der Ausbildung zahlreicher Zelloberflächenstrukturen, die sowohl an niedrigen als auch an hohen Passagen nachweisbar sind. Bei starker Vergrößerung erkennt man auf der rauhen, teils zerklüftet wirkenden Oberfläche zahlreiche Mikrovilli. Daneben kommen schlankere, tentakelartige Fortsätze, die sog. Filopodien vor. Sie sind in der Nähe der Zellmembran von mehr kolbiger Gestalt und enden dann in langen, haarartig dünnen Ausläufern. An zahlreichen Zellen zeigen sich stellenweise faltenartige Ausbuchtungen, die Lamellipodien, bzw. mehr kolbig bis kugelförmige Auswüchse, die sog. "Blebs" oder Exozyten.

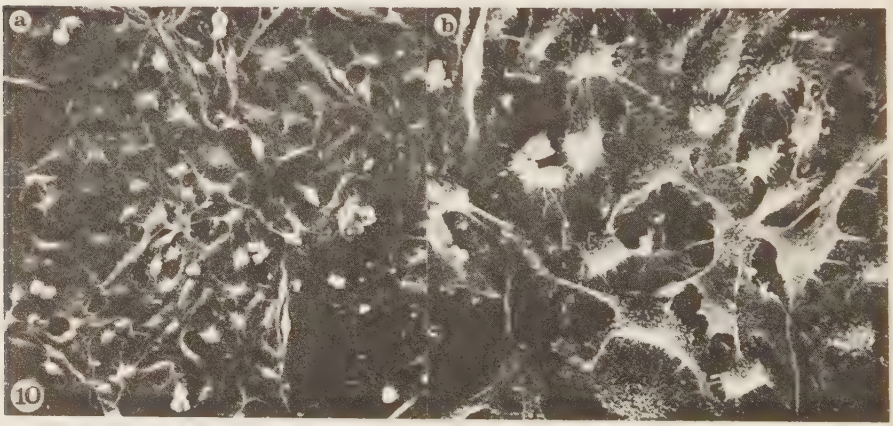

Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopisches Übersichtsbild an der 15. Passage der Zellkultur des Astrozytoms (Primärtumor B) mit zahlreichen kugeligen Zellen ohne Zellfortsätze (a) neben flach ausgebreiteten Zellen mit angedeuteten Fortsätzen (b);
a: 290x, b: 730x

5. Immunofluoreszenz (S-100)

Beide Tumoren wurden auf das Vorkommen des hirnspezifischen S-100-Proteins untersucht.

Die meisten Zellen der angelegten Kulturen zeigen im fixierten Zustand eine für das gliaspezifische S-100-Protein spezifische Fluoreszenz im Zytoplasma und an der Zellmembran.

Bei Tumorkultur A konnte in frühen Subkulturen eine mäßige Fluoreszenz, neben Zellen mit keiner spezifischen Fluoreszenz beobachtet werden. Die fluoreszierenden Strukturen sind im Zytoplasma und in den Zellfortsätzen kaum im Perikaryon lokalisiert (Abb. 11). In höheren Passagen des Tumors A zeigt sich eine gleichmäßige Fluoreszenz, am intensivsten im Zytoplasma.

Tumorkultur B zeigt über die ganze Kultivationsdauer hinweg eine gleichbleibend positive Fluoreszenz, die vor allem im Zytoplasma und an der Zellmembran lokalisiert ist (Abb. 12).

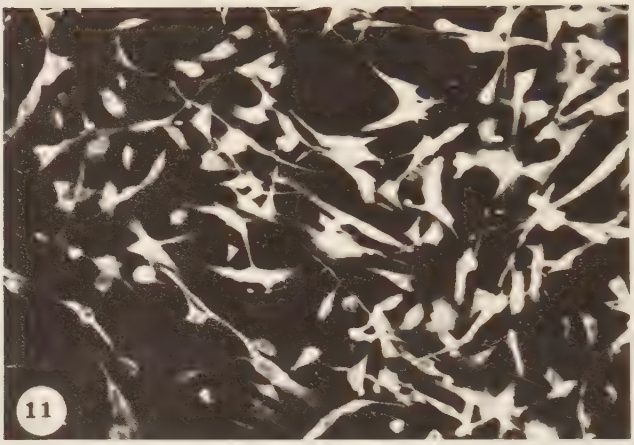

Abb. 11: Immunofluoreszenznachweis des S-100-Proteins an der Zellkultur von Tumor A (15. Passage): Spezifische Fluoreszenz vor allem im Zytoplasma und in den Zellfortsätzen; 200x

Abb. 12: Immunofluoreszenznachweis des S-100-Proteins an der Zellkultur von Tumor B (15. Passage): Deutlich unterschiedliche Fluoreszenz unter den verschiedenen Zellpopulationen; 200x

6. Zelldifferenzierung durch Behandlung mit DB-cAMP

Die Wirkung von 1 mM DB-cAMP auf die Morphologie der unterschiedlichen Zellinien wird in Abb. 13 verdeutlicht. Der Haupteffekt lag in der Ausbildung von langen Zellfortsätzen. Die Fortsatzausbildung ging bei beiden Zellinien (Tumor A und B) mit einer Abnahme der Proliferationsgeschwindigkeit und teilweise auch mit einer Schrumpfung des Zytoplasmasaums einher.

Die erste Untersuchung der Zellen nach Zugabe von DB-cAMP erfolgte nach 12 Stunden. Es zeigte sich bereits eine deutliche Ausbildung von Fortsätzen, die in den folgenden 12 Stunden noch erheblich in der Länge zunahmen. Nach 24 Stunden scheint das Maximum der Wirkung erreicht zu sein, denn auch durch erneute Zugabe von DB-cAMP nach diesem Zeitpunkt kam es zu keiner wesentlichen Veränderung mehr. Ließ man die Zellen über 36 Stunden und mehr, nur einmal mit DB-cAMP versetzt, im Brutschrank, so kam es spätestens nach 36 Stunden zum Einstellen der Fortsatzbildung, was bedeutet, daß es bereits nach etwa 24 Stunden zum Abbau des DB-cAMP kommt.

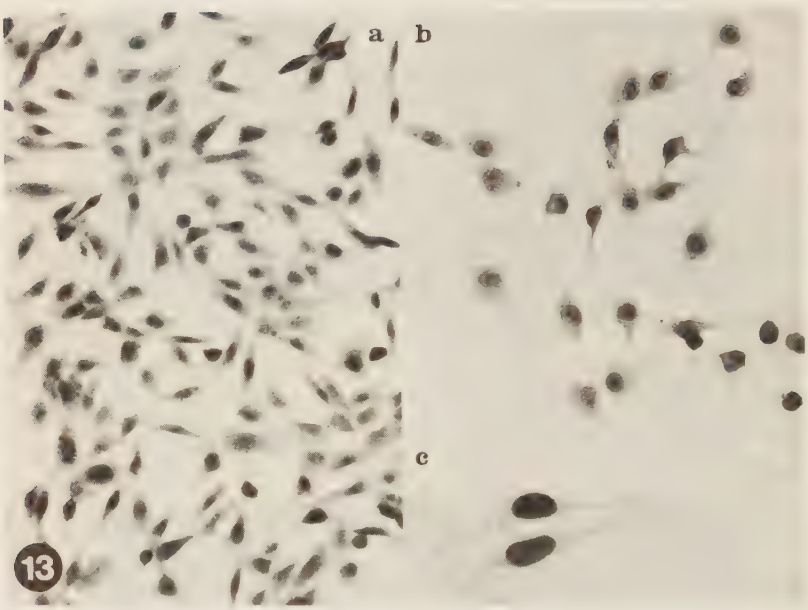

Abb. 13: Zellkulturaufnahme von Tumor A in der 80. Passage mit deutlich verkürzten bzw. fehlenden Zellfortsätzen (a); nach Zugabe von DB-cAMP kommt es erneut zur Ausbildung von Zellfortsätzen (b), die teilweise mit einer Schmälerung des Zytoplasmasaums einhergeht (c). HE a, b: 200x, c: 480x

7. Chromosomenanalyse

MINOUCHI (1928) konnte als erster mittels Untersuchungen an Spermatogonien die Chromosomenzahl beim Hund mit 78 festlegen. Diese Zahl konnte in späteren Untersuchungen bestätigt werden (AHMED 1941, MOORE und LAMBERT 1963).

Numerische und strukturelle Untersuchungen wurden an unseren Kulturen von Tumor A und B an jeweils einer niedrigen, einer hohen Subkultur sowie an einer Klonkultur durchgeführt. Pro Kultur wurden 20-30 Mitosen ausgewertet.

Tumor A:

CHROMOSOMENZAHL	% ZELLEN		
	10. Passage	70. Passage	Klon
40 - 50	15%	10%	-
51 - 60	10%	15%	20%
61 - 70	10%	30%	70%
71 - 80	50%	30%	-
größer 80, kleiner 150	15%	15%	10%

Tumor B:

CHROMOSOMENZAHL	% ZELLEN		
	10. Passage	70. Passage	Klon
40 - 50	10%	5%	5%
51 - 60	20%	15%	20%
61 - 70	25%	45%	55%
71 - 80	5%	35%	-
größer 80, kleiner 150	40%	-	20%

Auffällig ist, daß in den Zellinien keine Mitosen im diploiden Bereich gefunden werden konnten. Es hat sich keine Häufung ganzzahliger Vielfacher einer bestimmten Grundzahl von Chromosomen ergeben. Es konnte somit kein einheitlicher Chromosomensatz festgelegt werden. Im Laufe der Kultivation kommt es in beiden Tumorkulturen zu einem Chromosomenverlust.

Strukturabweichungen an den Chromosomen sind in der Form vorhanden, daß es in hohen Subkulturen sowohl bei Tumor A als auch bei Tumor B zum Auftreten zahlreicher metazentrischer Formen kommt (Abb. 14). Dies ist deshalb ein ungewöhnlicher Befund, weil es sich bei den 76 Autosomen des Hundes im Normalfall um ausnahmslos akro- bzw. telozentrische Formen handelt.

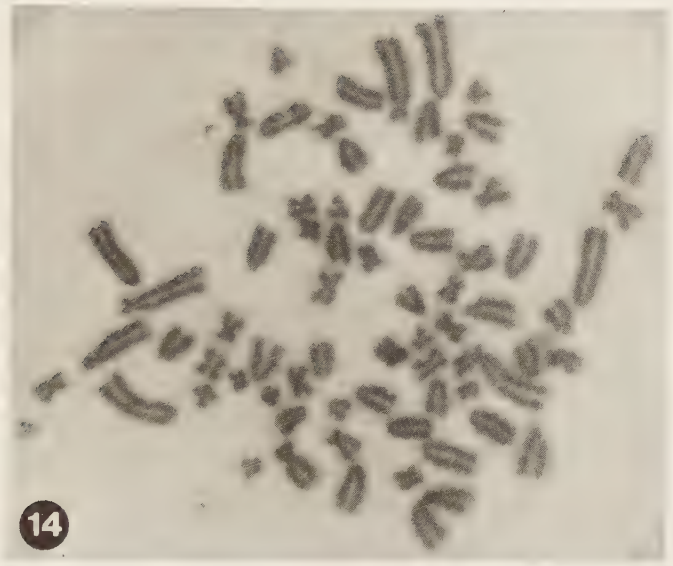

Abb. 14: Typische kleine bis mittelgroße metazentrische Chromosomen in hohen Passagen der Tumorkulturen (70. Passage der Kultur von Tumor A) Giemsa-Färbung; 1200x

E. DISKUSSION

Bei der histologischen Diagnose von Hirntumorbiopsien kann es vorkommen, daß in einem Tumor unterschiedliche neoplastische Gewebskomponenten gefunden werden. Durch weitere Untersuchungen kann geklärt werden, ob es sich um das gleichzeitige Auftreten gliöser und mesenchymaler Blastomelemente handelt.

In der Literatur wird über das Vorkommen gliös-mesenchymaler Mischgeschwülste beim Menschen berichtet (FEIGIN et al. 1955; RUBINSTEIN 1956; KERNOHAN und UIHLEIN 1962). Solche Mischgeschwülste sind überdies aus der experimentellen Pathologie der Hirntumoren bekannt (ZIMMERMANN 1955; PERESE und MOORE 1960; DRUCKREY et al. 1964). MEYER (1919/20) bezeichnet solche Mischgeschwülste, in denen Gewebselemente,die von verschiedenen Keimblättern abstammen, gleichzeitig blastomatös entartet sind, als Kompositionstumoren.

RUBINSTEIN (1956, 1964) unterscheidet hierbei prinzipiell zwei verschiedene Anordnungen der Tumorkomponenten:

1. Innerhalb der neuroektodermalen Komponente bildet sich ein von den Gefäßen ausgehendes Sarkom, so daß es im histologischen Bild zu einer engen Verflechtung beider Tumorkomponenten kommt.
2. Die neuroektodermale Komponente liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem in sich geschlossenem Sarkomgewebe, wobei es höchstens an den Grenzzonen zu einem Kontakt zwischen beiden Arealen kommt.

Über letztere Anordnung, auch Kollisionstumor genannt, finden sich nur wenige Angaben in der Literatur (RUBINSTEIN 1956; KLEIHUES 1965; MAYO und BARRON 1966).

Vielmehr überwiegen die Angaben über die "eigentlichen Glio-Sarkome" mit sekundärer blastomatöser Umwandlung des bindegewebigen Stromas.

In unserem Fall der gliös-mesenchymalen Mischgeschwulst fällt das völlig unterschiedliche histologische Bild, sowie die allenfalls an den Grenzzonen zur Verzahnung kommenden, ansonsten ziemlich scharf voneinander getrennten Tumorzellpopulationen auf. Insbesondere das Fehlen von Übergangsformen zwischen den Tumorkomponenten berechtigt zu der Annahme, daß es sich hier um zwei verschiedene und wahrscheinlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten entstandenen Geschwülste handelt, die damit in die Gruppe der sog. Kollisionstumoren einzuordnen wären.

Unter den neurogenen Tumoren gehören die Astrozytome in die Gruppe der gut kultivierbaren Hirntumoren. KERSTING (1968) reiht sie, zusammen mit den Ependymomen und Neurinomen, in die Gruppe der neuroektodermalen Geschwülste mit mittlerer Proliferationsgeschwindigkeit in vitro ein. COSTERO und POMERAT (1955), KERSTING (1961) und LUMSDEN (1963) berichten eingehend über die Kultivation von Großhirnastrozytomen. KERSTING (1961) unterteilte die Astrozytome nach Zell- und Wachstumsform in vitro in folgende Untergruppen:

a) fibrilläre Astrozytome,
b) zellreich-protoplasmatische Astrozytome und
c) maligne Astrozytome.

Die von uns erhobenen Befunde an Zellkulturen von Tumor A bzw. B bezüglich Proliferationsgeschwindigkeit und Fortsatzbildung decken sich im wesentlichen mit den Beobachtungen von KERSTING (1961).

In vitro kommt es bei Tumor A nach etwa 20-30 Subkultivationen oder zeitlich gesehen nach 2-3 monatiger Kultivation zu anaplastischen Veränderungen insoweit als die Zellen die Ausbildung der für sie typischen Fortsätze einstellen. MANUELIDIS (1969) konnte an menschlichen Glioblastomzellinien beobachten, daß die Zellen im Laufe der Kultivation ein epitheliales Aussehen annehmen und jegliche Fortsatzbildung einstellen. LUMSDEN (1963) bezeichnet diesen Vorgang als "Differenzierung der Zelle in einen einfacheren Status", während THUST (1976) dies als einen "Adaptationsprozeß der Zelle an die Bedingungen in vitro" ansieht. Das Einstellen der Fortsatzbildung im Laufe der Kultivation konnte auch von CRAVIOTO et al. (1972) sowie von FORNATO und SCHIFFER (1972) beobachtet werden. Die Frage, ob der Übergang zu "epithelialem Wachstum" eine morphologische Entdifferenzierung in vitro (KERSTING 1961) im Sinne einer Adaptation darstellt, und die Zellen dabei ihre Identität mit dem Ursprungsgewebe beibehalten, kann durch den Nachweis des S-100-Antigens geklärt werden. Wie durch die Immunofluoreszenzbefunde an den Kulturen von Tumor A und Tumor B gezeigt werden konnte, handelt es sich um eine Reinkultur von Zellen neuroektodermaler Herkunft. Überdies konnte festgestellt werden, daß die Fähigkeit der Tumorzellen, das S-100-Protein zu synthetisieren, auch in Langzeitkulturen nicht verlorengegangen ist.

Interessanterweise kam es bei beiden Tumorzellkulturen durch die Behandlung mit einem Derivat des cyklischen Adenosinmonophosphats, dem DB-cAMP, erneut zur Ausbildung langer Zellfortsätze. Dies könnte bedeuten, daß es sich bei den morphologischen Zellveränderungen im Laufe der Kultivation von Tumor A um einen reversiblen Vorgang handelt.

Dagegen kommt es bei Tumor B unter dem Einfluß von DB-cAMP in der Kultur zu einer teilweisen Neubildung von Fortsätzen. Der Effekt der DB-cAMP-Behandlung beruht auf einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Zu dieser Erhöhung kommt es u.a. durch

a) die kompetitive Hemmung des intrazellulären cAMP-Abbaus,
b) die Hemmung der cAMP-Phosphordiesterase sowie
c) die Resistenz des DB-cAMP gegen die Inaktivierung durch die Phosphordiesterase (HALLE 1976).

Das DB-cAMP fördert die Anheftung und Ausbreitung der Zellen auf ihrer Unterlage und erhöht somit die Zelladhäsion, wobei genaue molekulare Wirkungsmechanismen noch unbekannt sind. MACINTYRE et al. (1972) studierten die Wirkung des DB-cAMP an menschlichen Astrozytom- und Neuroblastomzellkulturen und konnten dabei folgende Befunde erheben:

1. Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen
2. Abnahme der Zelldichte und des Zellkontaktes
3. Fortsatzausbildung an den Zellen selbst.

Da wir die Versuche an Zellkulturen mit DB-cAMP nur über 48 Stunden ausdehnten, konnten in erster Linie die morphologischen Effekte des DB-cAMP in Form der Fortsatzbildung beobachtet werden.

Durch die wiederholte subcutane Inoculation der Zellen beider Tumoren an Balb c/nu nu Mäusen konnte gezeigt werden, daß sich im Verlauf von in vitro/in vivo Wechselpassagen die Struktur der Geschwulstzellen in unterschiedlichem Maße ändern kann. Histologisch zeigt sich vor allem bei Transplantaten von Tumor A eine ausgeprägte Pleomorphie, sowie das gehäufte Auftreten mehrkerniger Riesenzellen und zahlreicher teils abnormer Mitosefiguren. Offenbar sind die Prolifera-

tionsbedingungen für diese Elemente in vivo wesentlich günstiger als in vitro. Dafür spricht auch der Befund, daß diese riesenzellähnlichen Bildungen in der Kultur nach einigen Passagen nicht mehr auftreten. Die Transplantationsgeschwülste bekommen in vitro ein den Ursprungszellinien wieder vergleichbares Aussehen. Die Neigung der Zellen zu Pleomorphie bzw. zur Ausbildung maligne erscheinender Zellformen nach ihrer Retransplantation beobachteten auch KREMENTZ und GREENE (1953) sowie MANUELIDIS (1966) an menschlichen Glioblastomzellen.

Durch die wiederholte Transplantation unserer Zellinien konnte gezeigt werden, daß die Tumorogenität auch in Langzeitkulturen beibehalten wird.

Die Tendenz, der von Tumor A und B abgeleiteten Zellinien in vitro konstante Wachstumseigenschaften beizubehalten, konnte sowohl histologisch als auch elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Das Bild der Kulturen ändert sich mit zunehmender Kultivationsdauer nicht, auch nicht in der Form, daß irgendwelche Organisationsformen erkennbar wären. Das Ergebnis der Kultivation spricht dafür, daß es sich bei den von uns kultivierten Tumorzellen um Zellen handelt, die in vitro nur unter bestimmten Voraussetzungen zur Ausbildung von Differenzierungsformen fähig sind. Histologische sowie ultrastrukturelle Untersuchungen an Kulturen der Originaltumoren sowie der Transplantationstumoren stimmen weitestgehend überein. Für Astrozyten typische Zellstrukturen wie Zytoplasmafibrillen und spezielle Haftorganellen sind sowohl in Kulturen der Originaltumoren als auch in Kulturen der Transplantationstumoren nachweisbar.

Durch zytogenetische Untersuchungen können Zellkulturen auf ihre genetische Stabilität überprüft werden. Wie aus zahlreichen Untersuchungen über die Chromosomenzahlen tierischer und menschlicher Tumoren hervorgeht, zeichnen sich fast alle Geschwülste durch einen von der Norm abweichenden Karyotyp aus. Einen möglichen Zusammenhang zwischen chromosomaler Veränderung und Tumorentwicklung nahm bereits BOVERI (1914) an. Daneben werden heute noch zwei weitere Hypothesen vertreten:

a) Tumoren sind Folge einer eingetretenen Chromosomenveränderung,
b) Chromosomenveränderungen sind Folge oder Begleiterscheinung transformierter Zellen.

Obgleich das Primärereignis der Tumorentstehung nicht immer mit einer mikroskopisch nachweisbaren Veränderung des genetischen Materials in kausalen Zusammenhang zu bringen ist (FABER 1968), entwickeln sich dennoch als Folgeerscheinung in mehr oder weniger kurzer Zeit Chromosomenaberrationen, deren Ursache noch ungeklärt ist (MARK 1969).

Das Ergebnis der Chromosomenauszählung an Zellkulturen von Tumor A und Tumor B ergab für alle untersuchten Kulturen den eindeutigen Befund des Diploidieverlustes. Die durchschnittliche Chromosomenzahl pro Mitose liegt in der 10. Subkultur bei 84 (Tumor A) bzw. 87 (Tumor B). Für keine der ausgewerteten Mitosen konnte ein diploider Chromosomensatz festgelegt werden. Als Erklärung hierfür könnte man annehmen, daß der Verlust der Diploidie als Ausgangsereignis für das Zustandekommen einer vermehrten Zellteilungsrate eine Rolle spielen könnte. Dafür spräche auch, daß dieser Befund bereits an der 10. Passage der Kulturen erhoben werden konnte und

überdies keine der ausgewerteten Mitosen mehr im diploiden Bereich lag. Im Verlauf der Zellzüchtung kommt es bei beiden Tumorzellinien zu Chromosomenverlusten. An der 70. Subkultur läßt sich nur noch eine durchschnittliche Chromosomenzahl pro Mitose von 67 für Tumor A bzw. 66 für Tumor B ermitteln. Neben diesen Chromosomenverlusten kommt es zu strukturellen Chromosomenabweichungen in Form großer metazentrischer Formen erstmals in hohen Passagen der Kulturen. Aufgrund der Gleichartigkeit dieser Befunde an hohen Subkulturen beider Tumorzellinien nehmen wir an, daß exogene Faktoren im Laufe der Zellkultivation zu ihrer Entstehung geführt haben. THUST (1971) macht im Zusammenhang mit seinen bei Sarkomen des Rückenmarks bei Ratten gefundenen Veränderungen des Karyotyps auf zahlreiche möglicherweise diese Defekte auslösende Milieufaktoren, wie z.B. Serumart oder Serumzusammensetzung aufmerksam. ZUR HAUSEN et al. (1966) konnten zeigen, daß geänderte Umweltfaktoren wie z.B. ein veränderter Serumzusatz oder ein veränderter pH-Wert zur Auslese bestimmter Genotypen führen kann. Abweichungen können unter anderem auch durch die Serumart (PARSHAD und SANFORD 1968), durch Mangel an bestimmten Aminosäuren (FREED und SCHATZ 1969) oder durch Mykoplasmeninfektionen (FOGH und FOGH 1968) bedingt sein.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Aus zwei spontanen Hirntumoren bei Boxerhunden wurden Primärkulturen angelegt und aus diesen durch wiederholtes Passagieren unter Verwendung von Trypsin, permanente Zellkulturen etabliert. Zellen von Kurzzeit- und Langzeitkulturen wurden durch den Nachweis des S-100-Proteins charakterisiert. Langzeitkulturen beider Tumoren wurden in verschiedenen Passagen zur Erzeugung von Transplantationstumoren bei Balb c/nu nu Mäusen inoculiert. Primärtumoren, Transplantationstumoren und Zellkulturen wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. An Kurz- und Langzeitkulturen wurden zytogenetische Untersuchungen durchgeführt.

Aufgrund der vorliegenden Befunde können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Aus spontanen Hirntumoren des Hundes können permanente Zellkulturen in vitro etabliert werden.
2. Durch den Nachweis des gliaspezifischen S-100-Proteins kann die neuroektodermale Herkunft der Zellen bestimmt werden. Die Überprüfung bestimmter Syntheseeigenschaften an permanenten Kulturen dient zur Kontrolle der Identität von Zellkultur und Ursprungsgewebe.
3. Durch Transplantation der kultivierten Zellen können Transplantationstumoren induziert werden. Originaltumoren und Transplantationstumoren sind histologisch nur teilweise vergleichbar.
4. Die langzeitige Kultivation kann zum Verlust zytotypischer Strukturmerkmale führen. In Kulturen neuroektodermaler Herkunft sind diese Veränderungen durch Behandlung mit Dibutyryl-cyklischem Adenosinmonophosphat temporär reversibel.

SUMMARY

Two spontaneous canine brain tumors (one mixed tumor = A, one Astrocytoma = B) were propagated in vitro.
After repeated in vitro passages permanent cell cultures could be established. The glial character of the primary tumors as well as of the established cultures was proved by immunochemical controle of S-100-proteine. Later on material from different passages of the established cultures was inoculated subcutaneously into Balb c/nu nu mice in order to induce transplantation tumors. Tumor material of all steps of the experiment was simultaneously examined by light- and electron-microscopy. Studies concerning number and structure of chromosomes were performed in short term- and long term-cultures.
The following results were gained:

1. Spontaneous brain tumor of the dog can be established and maintained in vitro.
2. By immunological techniques it is shown that the cultivated tumors synthesize the S-100-proteine.
3. Real transplantation tumors can be induced by inoculation of cultivated tumor cells. Primary tumors and transplantation tumors are however only partially comparable.
4. In some long term-cultures of gliomas there may be a loss of cell-specific morphological features. In neuroectodermal tumor strains these alterations are temporarily reversible by means of addition of dibutyryl cyclic AMP to the culture fluid.

G. LITERATURVERZEICHNIS

AHMED, J.A.:
Cytological analysis of chromosome behaviour in three breeds of dogs.
Proc. Roy. Soc. Edinburgh 61, 107-118 (1941)

BENDA, P., J. LIGHTBODY, G. SATO, L. LEVINE and W.H. SWEET:
A differentiated rat glial cell strain in tissue culture.
Science 161, 370-371 (1968)

BENNETT, G.S. and G.M. EDELMAN:
Isolation of an acidic protein from rat brain.
J. biol. Chem. 243, 6234-6241 (1968)

BOVERI, T.:
Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
Jena: Fischer 1914

BUCKLEY, R.C.:
Tissue culture studies of glioblastoma multiforme.
Amer. J. Path. 5, 467 (1929)

CARREL, A. and L.E. BAKER:
The chemical nature of substances required for cell multiplication.
J. exp. Med. 44, 503 (1926)

COONS, A.H.:
The application of fluorescent antibodies to the study of naturally occurring antibodies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 69, 658-662 (1957)

COSTERO, J. and C.M. POMERAT:
Standard cellular morphology of gliomas in vitro as compared with explanted normal brain cells.
Excerpta medica (Amst.) Sect. 8, 821 (1955)

CRAVIOTO, H., L. PALEKAR, E. WEISS and K. BENNETT:
Experimental neurinoma in tissue culture.
Acta neuropath. (Berl.) 21, 154-164 (1972)

DAHME, E. und B. SCHIEFER:
Intracranielle Geschwülste bei Tieren.
Zbl. Vet. Med. 7, 341-363 (1960)

DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC und R. PREUSSMANN:
Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosoharnstoff.
Naturwissenschaften 51, 144-146 (1964)

DRUCKREY, H., C. LANDSCHÜTZ und S. IVANKOVIC:
Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems. II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen.
Z. Krebsforsch. 73, 371-386 (1970)

FABER, E.:
Biochemistry of carcinogenesis.
Cancer Res. 28, 1859-1869 (1968)

FEIGIN, I.H. and S.W. GROSS:
Sarcoma arising in glioblastoma of the brain.
Amer. J. Path. 31, 633-653 (1955)

FISCHER, A.:
Observations of the division of sarcoma cells in vitro.
J. Cancer Res. 9, 71 (1925)

FOGH, J. and H. FOGH:
Experimental alteration of FL amnion cells with mycoplasma.
In: KATSUTA, H. (Ed.): Cancer cells in culture.
Tokyo: University Press, pp. 241-259 (1968)

FORNATO, L. and D. SCHIFFER:
In vitro culture observations on Neurinoma induced experimentally in the rat by ethylnitrosourea.
Acta neuropath. 20, 199-206 (1972)

FRANKHAUSER, R. und H. LUGINBÜHL:
Zentrales Nervensystem.
In: JOEST, E. (Ed.): Handbuch der speziellen Pathologischen Anatomie III.
Berlin-Göttingen: Parey 1968

FREED, J.J. and S.A. SCHATZ:
Chromosome alteration in cultured cells deprived of single essential amino acids.
Exp. Cell Res. 55, 393-409 (1969)

GREENE, H.S.N. and H. ARNOLD:
The homologous and heterologous transplantation of brain and brain tumors.
J. Neurosurg. 2, 315-331 (1945)

HAGLID, K.G. and D. STAVROU:
Water-soluble and pentanol-extractable proteins in human brain normal tissue and human brain tumors, with special reference to S-100 protein.
J. Neurochem. 20, 1523-1532 (1973)

HAGLID, K.G., C.-A. CARLSSON and D. STAVROU:
An immunological study of human brain tumors concerning the brain-specific proteins S-100 and 14. 3. 2.
Acta neuropath. (Berl.) 24, 187-196 (1973b)

HAGLID, K.G., L. RÖNNBÄCK and D. STAVROU:
Purification of soluble glycoproteins from human nervous tissue and liver.
J. Neurochem. 24, 1053-1057 (1975)

HALLE, W.:
Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren.
Stuttgart-New York: G. Fischer 1976

HANSTEEN, J.-L.:
Chromosome studies in glial tumors.
Europ. J. Cancer 3, 183-191 (1967)

HARRISON, R.G.:
Observations on the living developing nerve fibre.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 4, 140 (1907)

HENSCHEN, F.:
Tumoren des Zentralnervensystems und seiner Hüllen.
Bd. XIII/3. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955

HERSCHMAN, H.R.:
Synthesis and degradation of a brain-specific protein (S-100 protein) by clonal cultured human glial cells.
J. biol. Chem. 246, 7569-7571 (1971)

HOWARD, E.B. and S.W. NIELSEN:
Neoplasia of the boxer dog.
Amer. J. vet. Res. 26, 1121-1131 (1965)

HYDEN, H.:
Quantitative assay of compounds in isolated, fresh nerve cells and glial cells from control and stimulated animals.
Nature 184, 433-435 (1959)

HYDEN, H. and B. McEWEN:
A glial protein specific for the nervous system.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 354-358 (1966)

KERNOHAN, J.W. and A. UIHLEIN:
Sarcomas of the brain.
Springfield (Ill.): Thomas Publ. 1962

KERSTING, G.:
Die Gewebszüchtung menschlicher Hirngeschwülste.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1961

KERSTING, G.:
Tissue culture of human gliomas.
Progr. neurol. Surg. 2, 165-202 (1968)

KIAER, S.:
Cultures of adult tissues in homologous and heterologous medium.
Arch. exp. Zellforsch. 1, 115 (1925)

KLEIHUES, P.:
Gibt es im Gehirn echte Kompositionstumoren?
Z. Krebsforsch. 67, 262-271 (1965)

KREDEL, F.E.:
Tissue culture of intracranial tumors with note on meningiomas.
Am. J. Path. 4, 337 (1928)

KREDEL, F.E.:
Intracranial tumors in tissue culture.
Arch. Surg. 18, 2008 (1929)

KREMENTZ, E.T. and H.S.N. GREENE:
Heterologous transplantation of human neural tumors.
Cancer 6, 100-110 (1953)

LIGHTBODY, J., S.E. PFEIFFER, P.L. KORNBLITH and H. HERSCHMAN:
Biochemically differentiated clonal human glial cells in tissue culture.
J. Neurobiol. 4, 411-417 (1970)

LISS, L.:
The use of tissue cultures in the study of brain tumors.
Progr. Exp. Tumor Res. (Basel) 17, 93-110 (1972)

LJUNGREEN, C.A.:
Von der Fähigkeit des Hautepithels außerhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation.
Dtsch. Z. Chirurg. 47, 608 (1897/98)

LOEB, L.:
Über die Entstehung von Bindegewebe, Leukozyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebeteile zu züchten.
Chicago: M. Stern & Co. 1897

LUBS, H.A. and J.H. SALMON:
The chromosomal complement of human solid tumors. II. Karyotypes of glial tumors.
J. Neurosurg. 22, 160-168 (1965)

LUGINBÜHL, H.:
Zur vergleichenden Pathologie der Tumoren des Nervensystems.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 104, 305-322 (1962a)

LUMSDEN, C.E.:
Differentiation and de-differentiation in cultures of tumors of the astrocytoma-glioblastoma group.
Proc. 2nd int. Cong. Neuropath., Part I, 279, Excerpta med. Found., Amsterdam: 1955a

LUMSDEN, C.E.:
The study of tissue culture of tumors of the nervous system.
In: RUSSEL, D.S. and L.J. RUBINSTEIN (Eds.): Pathology of tumors of the nervous system. London: Arnold Ltd., pp. 334-430 (1963)

MACINTYRE, E.H. and C.J. WINTERSGILL:
The responses in culture of human tumor astrocytes and neuroblasts to N^6, O^2-Dibutyryl-Adenosine 3',5'-Monophosphoric Acid.
J. Cell Sci. 11, 639-667 (1972)

MADERSPACH, K. and T. FARKAS:
The effect of catecholamines on cell motility in mouse fibroblasts.
Life Sci. 12, 413-418 (1973)

MANUELIDIS, E.E.:
Heterologous transplantation of two tissue culture lines of glioblastoma multiforme.
Proc. Sci. Exp. Biol. Med. 107, 636-639 (1961)

MANUELIDIS, E.E.:
Long-term lines of tissue cultures of intracranial tumors.
J. Neurosurg. 22, 368-373 (1965)

MANUELIDIS, E.E.:
The fate of heterologously transplanted glioblastoma multiforme in the eye of the guinea pig.
Amer. J. Path. 48, 65-89 (1966)

MANUELIDIS, E.E.:
Experiments with tissue cultures and heterologous transplantation of tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 159, 409-431 (1969)

MARCUS, P.I., S.J. CIECIURA and T.T. PUCK:
Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.
J. exp. Med. 104, 615 (1972)

MARK, J.:
Rous sarcomas in mice: the chromosomal progression in primary tumors.
Europ. J. Cancer 5, 307-315 (1969)

MAYO, C.M. and K.D. BARRON:
Concurrent glioma and primary intracranial sarcoma. A report of two cases and a review of literature.
Neurology (Minneap.) 16, 662-672 (1966)

MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN:
Virologische Arbeitsmethoden, Band I.
Stuttgart: Fischer 1974

McGRATH, J.T.:
Primary brain tumors in the dog.
J. Neuropath. exp. Neurol. 16, 108 (1957)

Mc GRATH, J.T.:
Neurologic examination of the dog.
Philadelphia: Lea and Febiger, pp. 178-185 (1960)

McGRATH, J.T.:
Intracranial pathology of the dog.
Acta neuropath. 1, 3-4 (1962)

MEYER, R.:
Beitrag zur Verständigung über die Namengebung in der Geschwulstlehre.
Zbl. allg. Path. path. Anat. 30, 291-296 (1919/20)

MINOUCHI, O.:
The spermatogenesis of the dog, with special reference to meiosis.
Jap. J. Zool. 1, 255-268 (1928)

MOORE, W. and P.D. LAMBERT:
The chromosomes of the Beagle dog.
J. Hered. 54, 273-276 (1963)

MOORE, B.W.:
A soluble protein characteristic of the nervous system.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 739-744 (1965)

PARSHAD, R. and K.K. SANFORD:
Effect of Horse Serum, Fetal Calf Serum and Bovine Serum on Neoplastic Conversion and Chromosomes of Mouse Embryo Cells in Vitro.
J. Nat. Cancer Inst. 41, 767-779 (1968)

PERESE, D.M. and G.E. MOORE:
Methods of induction and histogenesis of experimental brain tumors.
J. Neurosurg. 17, 677-698 (1960)

PEREZ, V.J. and B.W. MOORE:
Wallerian degeneration in rabbit tibial nerve: changes in amounts of the S-100 protein.
J. Neurochem. 15, 971-977 (1968)

PFEIFFER, S.E., H.R. HERSCHMAN, J. LIGHTBODY and G. SATO:
Synthesis by a clonal line of rat glial cells of a protein unique to the nervous system.
J. cell. Physiol. 75, 329-340 (1970)

PFEIFFER, S.E. and W. WECHSLER:
Biochemically differentiated neoplastic clone of Schwann cells.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 2885-2889 (1972)

PONTEN, J. and E.H. MACINTYRE:
Long-term culture of normal and neoplastic human glia.
Acta path. microbiol. scand. 74, 465-486 (1968)

RUBINSTEIN, L.J.:
The development of contigous sarcomatous and gliomatous tissue in intracranial tumors.
J. Path. Bact. 7, 441-459 (1956)

RUBINSTEIN, L.J.:
Morphological problems of brain tumors with mixed cell population.
In: ZÜLCH and WOOLF: Classification of brain tumors.
Acta neurochir. (Wien) 10, 141-148 (1964)

RUSSELL, D.S. and J.O.W. BLAND:
Study of gliomas by the method of tissue culture.
J. Path. Bact. 36, 273 (1933)

SCHRÖDER, R. und H. KAESS:
Atypische Mitosen bei menschlichen Hirntumoren (Medulloblastome und Glioblastome).
Acta neuropath. (Berl.) 20, 171-173 (1972)

SOLOWAY, A.H., V.H. MARK, E.G. DUKAT and R.N. KJELLBERG:
Chemotherapy of brain tumors. 1. Transplanted murine ependymoblastomas.
Cancer Chemother. Rep. 36, 1-4 (1964)

STAVROU, D. und K.G. HAGLID:
Experimentell induzierte Tumoren des peripheren Nervensystems beim Hund.
Naturwissenschaften 59, 317-318 (1972)

STAVROU, D., K. ZÄNKER, W. WEIDENBACH und M. KNEDEL:
Bedeutung der Histopochemie und des Isoenzymmusters der Lactatdehydrogenase für die Beurteilung der Dignität von Hirntumoren.
Z. Krebsforsch. 79, 319-331 (1973)

STAVROU, D., K.G. HAGLID und W. WEIDENBACH:
Experimentelle Induktion neurogener Tumoren beim Hund durch chronische parenterale Applikation von Methylnitrosoharnstoff.
Proc. of the VIIth International Congress of Neuropathology, Budapest: Akadémiai Kiadó 1975

SWAEN, G.J.V., T. VOSSENAAR and H.J.G. WYERS:
Abnormal mitosis in gliomas.
J. Path. Bact. 87, 75-78 (1964)

THUST, R.:
Karyotypveränderungen in Klonen eines N-Methylnitroso-harnstoff induzierten euploiden Sarkoms des Rückenmarks der Ratte in vitro.
Exp. Path. 5, 226-234 (1971)

THUST, R.:
Langzeitkulturen experimenteller Tumoren des Zentral-nervensystems als Modelle für neuroonkologische Forschungen.
Zbl. allg. Path. 120, 274-283 (1976)

VIRCHOW, R.:
Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.
Berlin: Hirschwald 1858

VOGELAAR, J.P.M. and E. EHRLICHMAN:
A feeding solution for cultures of human fibroblasts.
Am. J. Cancer 18, 28 (1933)

WARZOK, R., J. SCHNEIDER, D. SCHREIBER and W. JÄNISCH:
Experimental brain tumors in dogs.
Experimentia (Basel) 26, 303 (1970)

WILKINS, R.H. and A.S. KETCHAM:
Studies of glioma growth in mice. II. Immunity after excision.
Arch. Neurol. (Chic.) 9, 671-676 (1963)

WILKINS, R.H. and A.S. KETCHAM:
Studies of glioma growth in mice. I. Experiments concerning glioma growth and hepatic mitotic activity.
J. nat. Cancer Inst. 32, 871-880 (1964)

WILSON, C.B., L. KAUFMANN and M. BARKER:
Chromosome analysis of glioblastoma multiforme.
Neurology (Minneap.) 20, 821-828 (1970)

ZIMMERMANN, H.M.:
The nature of gliomas as revealed by animal experimentation.
Amer. J. Path. 31, 1 (1955)

ZIMMERMANN, H.M.:
Experimental brain tumors.
Neurol. med.-chir. 3, 29-50 (1961)

ZÜLCH, K.J.:
Die Hirngeschwülste in biologischer und morphologischer Darstellung.
Leipzig: Barth 1956

ZUR HAUSEN, H., A. LANGE und J. FRÖHLICH:
Die Serumkonzentration als Auslesefaktor in der Gewebekultur. Cytogenetische Untersuchungen an Mäusefibroblasten.
Cytologia 31, 339-348 (1966)

Herrn Professor Dr. E. Dahme möchte ich dafür danken, daß er mir die Anfertigung dieser Arbeit in seinem Hause ermöglichte und in stets großzügiger Weise Unterstützung gewährte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Stavrou für die Stellung des Themas und die mir jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. I.-D. Adler, Institut für Biologie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung München, für die geleistete Hilfe bei der Chromosomenanalyse.

Herrn Dr. K. Zänker, Institut für Experimentelle Chirurgie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, danke ich für die Anfertigung der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Nicht zuletzt möchte ich Frau Dr. B. Schröder, Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie für die freundliche Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen danken.

Für technische Hilfen danke ich Frau D. Wallmann und Frau E. Grabinger.

LEBENSLAUF

Am 27. 10. 1952 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Maximilian Schmid und seiner Frau Maria, geb. Kotz, in Büderich geboren.

Von 1959-1963 besuchte ich die Volksschule in Kirchseeon. Von 1963-1969 war ich im Internat der Englischen Fräulein in Nymphenburg und besuchte das Mädchengymnasium Maria Ward. 1969 wechselte ich auf das Neusprachliche Gymnasium in Grafing über, an dem ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1972/73 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Tiermedizin. Am 26. Oktober 1977 bestand ich das Tierärztliche Staatsexamen.

Im Januar 1977 begann ich am Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät München mit der vorliegenden Arbeit.

Im August 1978 heiratete ich den Gastronom Bernd Müller.